Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. G. Röhrborn

Studien zur Phänotypen-Verteilung der Enzymsysteme Glutamat-Oxalacetat-Transaminase M (GOT_M), Glyoxalase I (Glo I) und Esterase D (EsD) im Düsseldorfer Raum

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Ellen Bierotte
aus Wuppertal

1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536502_0045

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. G. Röhrborn

Studien zur Phänotypen-Verteilung der Enzymsysteme Glutamat-Oxalacetat-Transaminase $_{M}$ (GOT_{M}), Glyoxalase I (Glo I) und Esterase D (EsD) im Düsseldorfer Raum

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ellen Bierotte aus Wuppertal

1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Arnold

Referent
gez.: Prof. Dr. Röhrborn

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Schweitzer

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
ALLGEMEINES ZU DEN ENZYMEN	2
MATERIAL UND METHODEN	
Untersuchungsmaterial	8
Aufarbeitung und Lagerung der Blutproben	8
Stärkegelelektrophorese	9
Färbemethoden zum Nachweis der Enzymsysteme	11
Statistische Auswertung	16
Photographische Dokumentation	16
Reagentien und Lösungen	16
ERGEBNISSE	
Anreicherung von Leukozyten aus Nativblut	17
Elektrophoresebedingungen zur gleichzeitigen Enzymauftrennung	18
Modifikationen des Färbenachweises	19
Lagerungsstabilität der untersuchten Enzyme	20
Einfluß der Enzymkonzentration und Ionenstärke auf die Proteintrennung	21
Polymorphismus der Enzymsysteme EsD, Glo I und GOT_M	21
Genotypen-Verteilung und Genfrequenzen der EsD, Glo I und GOT_M im Düsseldorfer Raum	28
DISKUSSION	30
ZUSAMMENFASSUNG	40
LITERATURVERZEICHNIS	41
DANKSAGUNG	51
LEBENSLAUF	52

EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Enzymsysteme Esterase D (EsD), Glyoxalase I (Glo I) und die mitochondrielle Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT_M) zeigen nach Auftrennung im Stärkegel einen Polymorphismus ihrer Enzymbanden. Während die EsD und die Glo I seit längerer Zeit zum Routineprogramm der Serogenetik gehören, ist erst durch die Arbeit von RITTER et al. (1979) eine gesicherte Technik zum Nachweis der GOT_M aus menschlichen Blutzellen bekannt geworden. Da bisher nur zwei Untersuchungen der GOT_M-Genfrequenzen im Raum Mainz (ANANTHAKRISHNAN et al., 1972) und aus Südwestdeutschland (RITTER et al., 1979) vorlagen, erschien es wünschenswert, im Hinblick auf Identitäts- und Vaterschaftsbegutachtungen weitere Informationen über das GOT_M-Enzymsystem zu erhalten, nicht zuletzt auch im Interesse einer Erhöhung der Ausschlußchance in Fällen unklarer Vaterschaft. Deshalb führten wir eine Analyse der Genfrequenzen im Düsseldorfer Raum durch.

Die durch RITTER und KÖMPF (pers. Mitteilung) entwickelte Methode zur simultanen Auftrennung der drei Enzymsysteme in einem elektrophoretischen Ansatz sollte am Institut für Humangenetik und Anthropologie zunächst etabliert und der Studie zur Phänotypen-Verteilung der EsD, Glo I und GOT_M im Düsseldorfer Raum zugrunde gelegt werden, um bei geringerem Zeit- und Arbeitsaufwand ein Maximum an Information zu erhalten.

UNIV. LEIDEN GSL.

ALLGEMEINES ZU DEN ENZYMEN

Das Interesse serologischer Untersuchungen lag in den letzten 20 Jahren auf dem Nachweis von Proteinen und deren Polymorphismen (zur Übersicht vgl. HARRIS et al., 1974). Eine Vielzahl verschiedener Enzyme können aus dem menschlichen Blut, aber auch aus Körpersekreten, wie z.B. Speichel, und Organpunktaten dargestellt werden. Dazu werden die Proteine durch elektrophoretische Verfahren aufgetrennt, wobei als Trägermedien Stärke, Agarose, Celluloseacetat und Polyacrylamid verwendet werden. Anschließend werden die Proteinfraktionen durch spezifische histochemische Farbreaktionen nachgewiesen (Zymogramm-Technik nach HUNTER et al., 1957).
Durch die Entwicklung empfindlicher Trenn- und Färbemethoden konnten verschiedene Phänotypen eines Enzyms differenziert werden. Familienuntersuchungen und Mutter-Kind-Studien bestätigten, daß diese elektrophoretischen Varianten die Manifestation einer unterschiedlichen genetischen Information sind (vgl. u.a. HOPKINSON et al., 1973). MARKERT et al. (1959) prägten für dieses Phänomen multipler Enzymformen infolge genetisch determinierter Unterschiede in der Primärstruktur den Begriff des "Isoenzyms". Isoenzyme kommen zum einen intraindividuell vor und werden dann in der Regel durch multiple Genloci kodiert. Als Beispiel hierfür seien die lösliche und die mitochondrielle Form der GOT genannt (vgl. CHEN et al., 1971). Andererseits können Isoenzyme auch interindividuell variieren, bedingt durch multiple Allelie an einem Genlocus. Diese ist verantwortlich für die Phänotypen-Verteilung eines

Enzyms innerhalb einer Stichprobe (HARRIS, 1974). In diesem Zusammenhang ist der Begriff des Enzympolymorphismus von Bedeutung. In einer gegebenen Population wird ein bestimmter Genlocus dann als polymorph definiert, wenn das häufigste Allel in einer Frequenz kleiner 0,99 vorkommt (vgl. HARRIS et al., 1974).

In den letzten 12 Jahren konnten die in dieser Arbeit untersuchten Enzymsysteme Esterase D, Glyoxalase I und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase $_{M}$ durch Elektrophoreseverfahren dargestellt werden. Die Studien an den drei Systemen lassen sich in ihren Ergebnissen folgendermaßen zusammenfassen: Die Esterase D (EsD) und ihr Polymorphismus wurden erstmals durch HOPKINSON et al. (1973) beschrieben. Sie ordneten dieses Enzym den unspezifischen Esterasen A, B und C zu (TASHIAN, 1961, 1969). Im Unterschied zu diesen früher beschriebenen Enzymen zeichnet sich die EsD durch die Fähigkeit zur Hydrolyse der fluorogenen Substrate 4-Methylumbelliferylacetat und -butyrat aus. Das pH-Optimum der EsD liegt bei pH 5,0 bis 5,5; das Molekulargewicht wurde nach Gelfiltration auf 60000 geschätzt (HOPKINSON et al., 1973). Die EsD ist in verschiedenen Geweben lokalisiert, wie z.B. Herz, Leber, Milz, Skelettmuskulatur sowie in Erythrozyten und Leukozyten (HOPKINSON et al., 1973). Ihre biologische Bedeutung ist bisher nicht geklärt (KÖHLER, 1978). Als Genort der EsD wurde Chromosom 13 bestimmt (van HEYNINGEN, 1975). Zur möglichen Beziehung dieses Enzyms zu Erkrankungen findet sich bei SPARKES et al. (1979) ein Hinweis darauf,daß

die EsD einem Gen-Dosis-Effekt unterliege und bei einem Patienten mit Trisomie 13 eine 1,5fach erhöhte Aktivität gefunden worden sei.

Der Polymorphismus der Erythrozyten-Glyoxalase I (Glo I) wurde erstmals von KÖMPF et al. (1975) beschrieben. Glo I und Glo II bilden mit Glutathion als Coenzym das sog. Glyoxalase-System (RACKER, 1951). Das pH-Optimum der Glo I liegt bei pH 6,8 (KÖMPF et al., 1975), das Molekulargewicht bei 52000 nach Anreicherung aus Schweineerythrozyten (MANNERVIK et al., 1972). Menschliche Erythrozyten enthalten die Glo I in relativ hoher Konzentration, hingegen nicht die Glo II (COHEN et al., 1945; VALENTINE et al., 1961). Die physiologische Rolle der Glo I ist möglicherweise in einer indirekten Stimulierung der Zellteilung zu sehen durch den Umsatz von Methylglyoxal, das als Zellinhibitor wirkt (SZENT GYÖRGYI et al., 1967). Auf Grund somatischer Hybridisierungsstudien wird Chromosom 6 als Genort angesehen (BENDER et al., 1976).

Die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) liegt beim Menschen in Form zweier Isoenzyme mit unterschiedlicher intrazellulärer Lokalisation vor: als GOT_S (s=soluble) oder lösliche Form im Zytosol, als GOT_M oder mitochondrielle Form in den Mitochondrien (FLEISHER et al., 1960). Wie bereits erwähnt, werden die beiden Isoenzyme durch getrennte Genloci determiniert (CHEN et al., 1971). Sie unterscheiden sich in ihrer Primärstruktur und somit auch in ihren physikochemischen, kinetischen und

immunochemischen Eigenschaften (WADA et al., 1964). Unter den beschriebenen Elektrophoresebedingungen wandert die GOT_S anodisch, die GOT_M hingegen kathodisch. Gesicherte Angaben zum Molekulargewicht der GOT_M fehlen bislang; ihr pH-Optimum liegt bei pH 7,5 (RITTER et al., 1979). Als Hauptkettenenzym des Gewebestoffwechsels (BERGMEYER, 1974) konnte die GOT in allen bisher untersuchten menschlichen Geweben mit höchsten Konzentrationen in Herz-, Skelettmuskulatur und Leber nachgewiesen werden (GUILBAULT, 1976). Ein Anstieg der Serum-GOT wird als Indikator für eine Schädigung dieser Gewebe gewertet, wie z.B. bei Myocardinfarkt, Muskeldystrophie oder Hepatitis (GUILBAULT, 1976). Reife Erythrozyten enthalten nur die GOT_S, während in Leukozyten und Retikulozyten beide Isoenzyme vorkommen (MANUCCI et al., 1966). Die GOT spielt eine wichtige Rolle im Kohlenstoff- und Stickstoff-Metabolismus der Zellen (WADA et al., 1964). Varianten der GOT_M beim Menschen wurden erstmals von DAVIDSON et al. (1970) beschrieben. Auch für die GOT_S wird ein genetischer Polymorphismus angenommen (CHEN et al., 1971).

Den Untersuchungen zur Esterase D, Glyoxalase I und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase $_M$ ist gemeinsam, daß in jedem System drei reproduzierbare Bandenmuster unterschiedlicher Häufigkeitsverteilung nachgewiesen werden konnten. Dabei handelt es sich um zwei homozygote Phänotypen 1 und 2, die sich durch jeweils eine Bande in unterschiedlicher Entfernung vom Auftragungsort darstellen, und einen heterozygoten Phänotypen 2-1, der neben den rein-

erbigen 1er und 2er Banden eine Intermediärbande aufweist. Umfangreiche Familienuntersuchumgen in allen drei Systemen bestätigten die Annahme, daß die drei Phänotypen durch zwei autosomal-kodominante Gene determiniert werden (vgl. HOPKINSON et al., 1973; KÖMPF et al., 1975; DAVIDSON et al., 1970).

Daneben finden sich Hinweise auf die Existenz sog. "seltener" Phänotypen, deren Inzidenz definitionsgemäß unter 1% liegt (vgl. HARRIS et al., 1974). Im System der Esterase D, dem bestuntersuchten der drei Enzymsysteme, wurden bisher insgesamt fünf weitere Phänotypen unabhängig voneinander in verschiedenen Gegenden beobachtet. Nach der Lage der Enzymbanden in Relation zu den vorher beschriebenen Phänotypen EsD 1, EsD 2 und EsD 2-1 wurden diese bezeichnet als EsD 3-1 (BENDER et al., 1974; BARGAGNA et al., 1975; RITTNER et al., 1975; WIEBECKE, 1976), EsD 4-1 und EsD 4-2 (BERG et al., 1976; GRÜNER et al., 1978), EsD 5-1 (MARTIN, 1979) sowie EsD 6-1 ("Rügen") (RADAM et al., 1980). Auch hier konnte in den meisten Fällen die genetische Grundlage durch Mutter-Kind- oder Familienuntersuchungen gesichert werden. Somit handelt es sich bei der Esterase D um ein Mehr-Allelen-System. Für den Glo I-Polymorphismus liegen außer dem Hinweis auf einen möglichen Phänotypen Glo 3-2 in einer italienischen Population (RANZANI et al., 1979) keine sicheren Angaben über seltene Phänotypen vor. Die Zahl der Untersuchungen zum Polymorphismus der GOT_M ist bisher gering, doch soll nach DAVIDSON et al. (1970) und HACKEL et al. (1972) ein Allel GOT_M^3 in negriden Populationen vorkommen.

Ein seltenes Phänomen, das in der Vaterschaftsbegutachtung praktische Bedeutung gewinnt, ist das Auftreten sog. stummer Allele. Hierbei handelt es sich in der Regel um Mutanten, die zu einem vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität führen. Da stumme Allele mit den herkömmlichen Elektrophorese- und Färbetechniken nicht erfaßt werden, kommt es zwangsläufig zu einer Fehltypisierung heterozygoter Nullvarianten als reinerbige Phänotypen. Untersuchungen von MARKS et al. (1977), SPARKES et al. (1979) und KOZIOL et al. (1980) geben Hinweise auf die Existenz eines stummen Allels EsD^{O} im Esterase D-System. Auch im Glyoxalase I-System kommt nach Arbeiten von RITTNER et al. (1978) und RUBINSTEIN et al. (1979) möglicherweise ein Nullallel vor.

MATERIAL UND METHODEN

Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial wurde Nativblut gesunder Blutspender aus dem Düsseldorfer Raum verwendet sowie Blutproben, die am hiesigen Institut im Rahmen der Familienuntersuchungen entnommen wurden. Blutproben von Ausländern blieben in dieser Studie unberücksichtigt.

Aufarbeitung und Lagerung der Blutproben

Die Blutproben wurden spätestens vier Stunden nach der Entnahme weiter verarbeitet. In einem ersten Schritt wurde das Serum durch Zentrifugation (8 Minuten, 3000 Upm, Heraeus-Christ Tischzentrifuge, Labofuge I, Festwinkelrotor) von den Blutzellen getrennt und abpipettiert. Das obere Drittel der Blutzellfraktion wurde dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung (1:2, v/v) versetzt und jeweils 5 Minuten zentrifugiert. Die gewaschenen Blutzellen wurden anschließend im Verhältnis 3:1 (v/v) mit Toluol überschichtet und im Eisbad zweimal 3 Sekunden sonifiziert (Sonifier B-12, Fa. Branson Sonic Power). Das Stroma wurde durch Zentrifugation entfernt (40 Minuten, 3000 Upm) und die wässrige Phase mit einer Pasteur-Pipette entnommen. Das so gewonnene stromafreie Hämolysat wurde für 1-2 Tage im Kühlschrank bei $+4^{\circ}C$ oder bis zu einem Monat bei $-18^{\circ}C$ aufbewahrt.

Stärkegelelektrophorese

Vor dem Beimpfen des Stärkegels wurden die Hämolysate im Verhältnis 3:1 (v/v) mit Sephadexlösung (4% Sephadex, 20% Saccharose in destilliertem Wasser) vermischt. Die Auftrennung der Enzymsysteme erfolgte durch horizontale Stärkegelelektrophorese nach der Methode von RITTER et al. (1979). Als Brückenpuffer wurde Tris-Histidin-HCl verwendet (200 mM Trishydroxymethylaminomethan, 150 mM L-Histidinmonohydrochlorid, pH 7,6). Der Gelpuffer wurde durch Verdünnen des Brückenpuffers mit 6 Teilen destilliertem Wasser hergestellt. In 1400 ml Gelpuffer wurden dann 200 g Stärke (Starch-Hydrolysed, Connaught Laboratories Limited, Endkonzentration 14%) unter ständigem Rühren bei 95°C während 20 Minuten gelöst (Wasserbad: Fa. Colora Meßtechnik GmbH). Die Stärkelösung wurde nach dem Entgasen auf eine 39 x 40 cm große Kühlplatte gegossen. Im Abstand von 11 cm von der Kathode wurde ein Schlitzformer (10 x 10 x 1 mm) eingesetzt und die Stärkelösung unter anschließender Kühlung (Thermomix 1480, Frigomix 1496, Fa. B. Braun) bei 1°C zum Gelieren gebracht. In die vorgeformten Taschen konnten maximal 100 µl der mit Sephadexlösung versetzten Hämolysate pipettiert werden. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte über Nacht (18-20 Stunden) bei einer Feldstärke von 9 Volt/cm (Netzgerät Modell 500/500, Fa. Desaga). Mit einer doppelten Lage Filterpapier (Schleicher-Schüll Nr.2316, 40 x 15 cm) wurde der Kontakt zwischen Gel und Brückenpuffer hergestellt. Um den Einfluß elektrolytischer Vorgänge und pH-Verschiebungen aus-

zuschließen, waren die Pufferträge aus zwei Kammern zusammengesetzt, die jeweils über eine doppelte Filterpapierbrücke miteinander verbunden wurden. Zum Schutz vor Verdunstung wurden das Gel und die Pufferträge mit einer Klarsichtfolie abgedeckt.

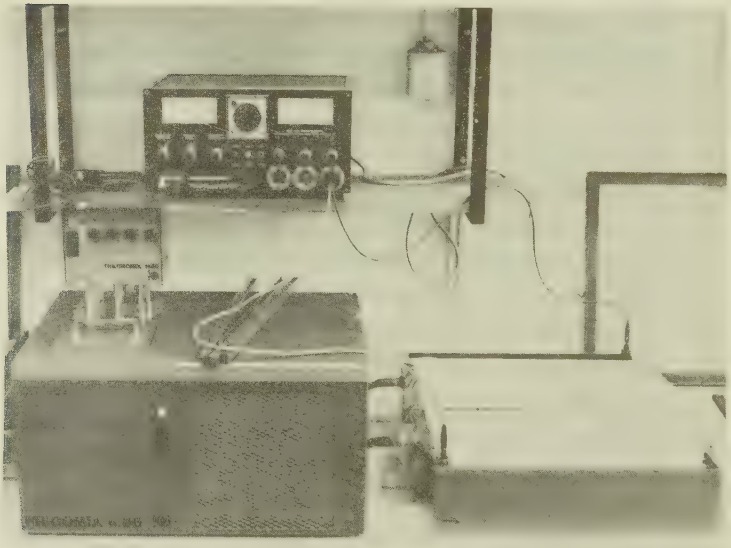


Abb.1: Stärkegelelektrophorese-Einheit

Färbemethoden zum Nachweis der Enzymsysteme

Nach Ablauf der Elektrophorese wurde das Gel mittels einer Schneidevorrichtung in Scheiben von 2 mm Dicke aufgeschnitten. Die Esterase D (EsD) wurde aus der Bodenplatte, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase $_{M}$ (GOT_M) und Glyoxalase I (Glo I) jeweils aus der ersten Schicht durch spezifische Farbreaktionen nachgewiesen.
In Abbildung 2 ist die relative Lage der aufgetrennten Enzymsysteme im horizontalen Stärkegel wiedergegeben.

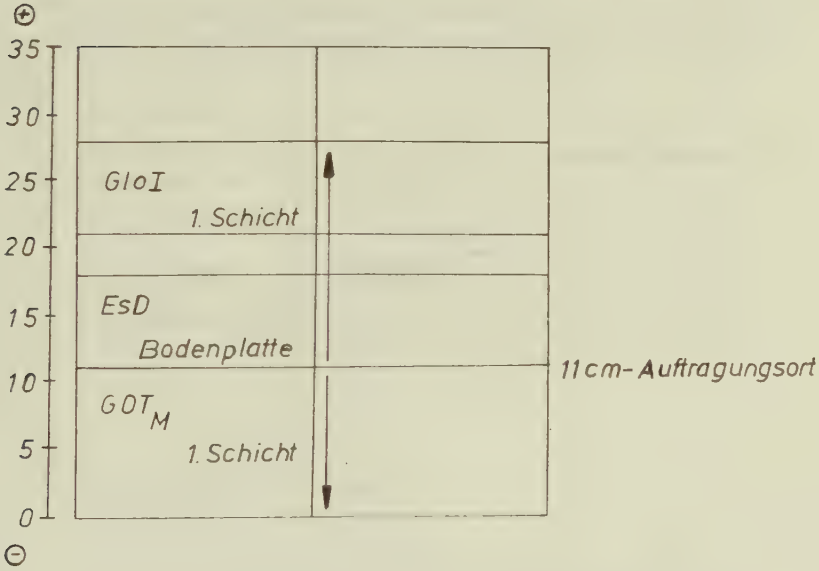


Abb.2: Relative Lage der aufgetrennten Enzymsysteme im horizontalen Stärkegel
(9 Volt/cm, 18-20 Stunden, 1°C)

Wie aus Abbildung 2 hervorgeht, wandert die GOT_M kathodenwärts, während die EsD und die Glo I in anodischer Richtung aufgetrennt werden.

GOT_M-Färbenachweis

Der enzymatische Färbenachweis der GOT_M erfolgte nach der Methode von RITTER et al. (1979) und basiert auf einer Formazanreaktion. Dabei wird das Tetrazoliumsalz MTT (Methylthiazolyltetrazolium) mit NADH (Nicotinamidadenosindinucleotid) zu einem dunkelblauen, unlöslichen Formazankomplex reduziert. PMS (Phenazinmethosulfat) katalysiert diese Reaktion. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt (modifiziert nach HARRIS, 1977).

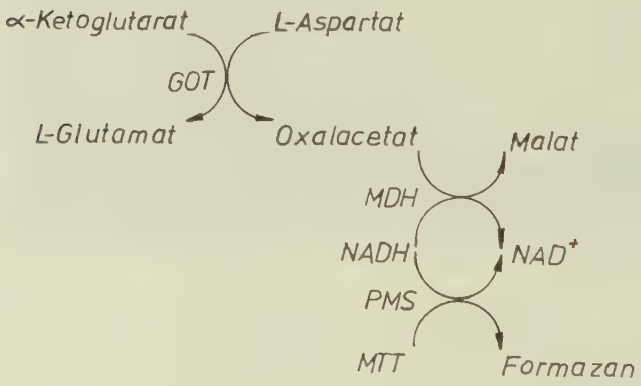


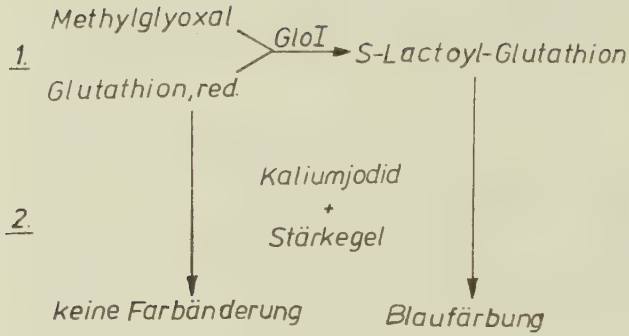
Abb.3: Färbenachweis der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase $_M$

Die Enzymbanden stellen sich als helle Zonen gegenüber dem blaugefärbten Gel dar (Negativfärbung).

Die Reaktionslösung für den spezifischen Färbenachweis wurde wie folgt zusammengestellt:
Zur Herstellung des Färbepuffers wurde eine Lösung von 100 mM Tris mit Histidin-HCl auf pH 7,4 eingestellt. In 30 ml Färbepuffer wurden 250 mM L(-)-Asparaginsäure bei 60°C gelöst und mit 1 N NaOH auf pH 8,2 eingestellt. Dazu wurden 30 mM α-Ketoglutarat, 1,9 mM NADH, 1,2 mM MTT (Fa. Serva, Heidelberg) und 0,4 mM Pyridoxalphosphat durch Sonifizieren (3 Sekunden) gelöst und anschließend 100 µl MDH (Malatdehydrogenase, spezifische Aktivität: ca. 1200 Einheiten/mg) pipettiert.
Die Gelscheiben wurden zwischen mit Reaktionslösung getränkten Filterpapieren (Schleicher-Schüll Nr. 2316) 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach konnten die Enzymbanden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden (350 nm). Die eigentliche Entwicklung der Gelscheiben erfolgte durch 15 Minuten Überschichtung mit PMS-Lösung (2 mg PMS, Fa. Serva, Heidelberg, in Leitungswasser), wodurch die Formazanreaktion eingeleitet wurde.

Glo I-Färbenachweis

Der enzymatische Färbenachweis der Glo I erfolgte nach der Methode von PARR et al. (1977). Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 4 schematisch wiedergegeben (modifiziert nach HARRIS, 1977).



1.: Enzymreaktion
2.: Gegenfärbung

Abb.4: Färbenachweis der Glyoxalase I

In 100 ml Glo I-Färbepuffer (100 mM Tris, 10 mM $CaCl_2$, 20 mM $MgCl_2$, mit Histidin-HCl auf pH 6,8 eingestellt) wurden 0,2 g reduziertes Glutathion (Endkonzentration: 6,5 mM), 2 mg MTT (Endkonzentration: 0,05 mM) und 2 ml Methylglyoxal (40% in Wasser, Fa. C. Roth, Karlsruhe) gelöst. Die Gelscheiben wurden ebenfalls mit in Reaktionslösung getränkten Filterpapieren beidseitig bedeckt und 25-30 Minuten bei 37°C inkubiert. Für die Überschichtungsreaktion wurde eine 0,7%ige Agarose-Lösung hergestellt (300 mg Agarose der Fa. Serva, Heidelberg, ad 45 ml destilliertes Wasser), auf ca. 40°C abgekühlt und dem Ansatz 1 ml KJ-Lösung (KJ 75,0 g, J_2 32,5 g ad 2500 ml destilliertes Wasser) zugesetzt. Nach Inkubation wurden die Gelscheiben mit Filterpapier abgetupft, um das überschüssige Färbereagens zu entfernen, und anschließend mit dem Jod-

Agar-Overlay übergossen. Die Enzymbanden lassen sich als intensiv blaue Zonen (Stärke-Jod-Komplexe) gegenüber den in Gegenwart von Glutathion entfärbten Gelbereichen nachweisen (Positivfärbung).

EsD-Färbenachweis

Die EsD wurde durch positive Fluoreszenzfärbung nach der Methode von HOPKINSON et al. (1973) nachgewiesen. In Abbildung 5 ist der Reaktionsablauf schematisch dargestellt (modifiziert nach HARRIS, 1977).

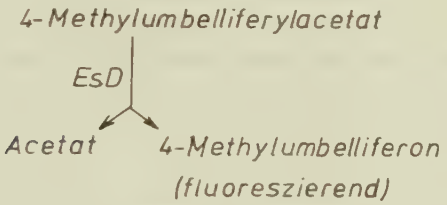


Abb.5: Färbenachweis der Esterase D

Für den spezifischen Färbenachweis wurde ein Acetatpuffer verwendet (11,4 ml Eisessig ad 1000 ml destilliertes Wasser, mit 1 N NaOH auf pH 5,2 eingestellt). 3 mg 4-Methylumbelliferylacetat wurden in 6 ml Aceton gelöst und ad 100 ml mit Färbepuffer versetzt. Die Gelscheiben wurden mit der Reaktionslösung unmittelbar übergossen. Bereits nach 2-3 Minuten Inkubation bei 37°C waren die Enzymbanden unter UV-Licht als fluoreszierende Zonen erkennbar.

Statistische Auswertung

Unter Annahme von Hardy-Weinberg-Bedingungen wurden die Beobachtungswerte der Genotypen-Verteilung mit den Erwartungswerten verglichen. Die Genfrequenzen wurden ermittelt nach:

$$p = \frac{2pp + pq}{2n} \quad \text{bzw.} \quad q = \frac{2qq + pq}{2n}$$

p,q: Genfrequenzen
pp, qq, pq: Beobachtungswerte der homozygoten und des heterozygoten Genotypen
n: Gesamtstichprobenumfang

Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte nach dem χ^2-Test (vgl. SACHS, 1969).

Photographische Dokumentation

Für die Photographien wurden Agfa-Ortho-25-Filme verwendet. Die Aufnahmen der GOT_M und der Glo I erfolgten im Durchlicht, die der EsD unter UV-Licht von 350 nm.

Reagentien und Lösungen

Soweit nicht anders erwähnt, wurden analysenreine Reagentien der Firma E. Merck, Darmstadt sowie Enzyme, Substrate und Cofaktoren der Firma Boehringer, Mannheim, verwendet.

ERGEBNISSE

Anreicherung von Leukozyten aus Nativblut

Die drei Enzymsysteme Esterase D, Glyoxalase I und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase $_M$ wurden aus menschlichen Blutzellen nachgewiesen. Untersuchungen zur Glo I und EsD haben gezeigt, daß sich infolge der relativ hohen intraerythrozytären Konzentration dieser Enzyme stromafreie Hämolysate zum Nachweis eignen (vgl. zur Übersicht VALENTINE et al., 1961; HOPKINSON et al., 1973). Die Darstellung der mitochondriellen GOT hingegen erforderte eine besondere Aufarbeitung der Blutproben. Bekanntlich enthalten Erythrozyten mit Ausnahme ihrer Vorstufen, der Retikulozyten, keine Mitochondrien (vgl. MANUCCI et al., 1966). Da die Konzentration von Retikulozyten im peripheren Blut gesunder Probanden vernachlässigbar gering ist, wurde eine vereinfachte Technik zur Anreicherung von Leukozyten aus Nativblut angewendet, die besonders für Routineuntersuchungen geeignet erscheint. Das obere Drittel der durch Zentrifugation isolierten Blutzellen enthält angereichert Leukozyten, die, da mitochondrienhaltig, für den Nachweis der GOT$_M$ eine Grundvoraussetzung sind.
Abbildung 6 stellt die Trennung der Blutzellen vom Serum schematisch dar.

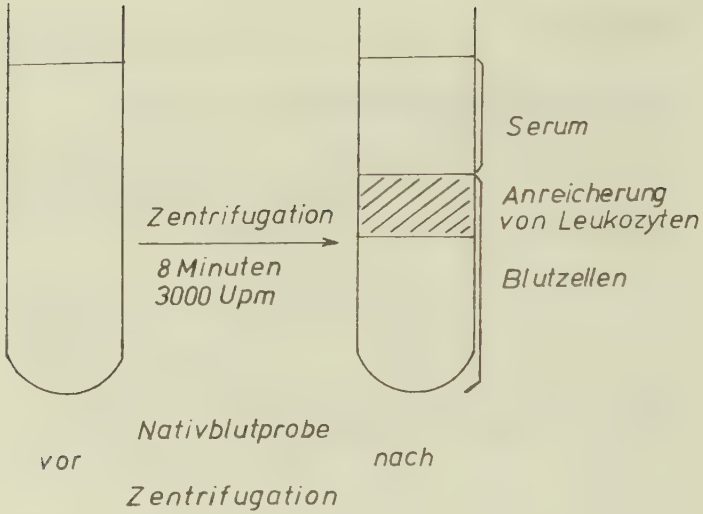


Abb.6: Anreicherung von Leukozyten im oberen Drittel der Blutzellfraktion

Elektrophoresebedingungen zur gleichzeitigen Enzymauftrennung

Eine gleichzeitige Auftrennung der Enzymsysteme setzte Konditionen voraus, unter denen alle drei Proteine getrennt dargestellt werden konnten. Aus diesem Grunde wurde der Einfluß der Elektrophoresebedingungen untersucht. Laufzeit und Stromstärke wurden variiert und durch unterschiedlich dicke Filterpapierbrücken der Widerstand verändert. Als optimale Bedingung für die gemeinsame Auftrennung hat sich dabei eine Feldstärke von 9 Volt/cm (Klemmspannung 320 Volt, Stromstärke 180 mA) bei einer Laufzeit von 18-20 Stunden erwiesen. Eine

verminderte Spannung, auch bei gleichzeitig verlängerter Laufzeit, beeinflußte besonders die Auftrennung der GOT_M. Die Banden dieses Enzymsystems wurden breiter und waren dadurch nicht mehr als klare Muster ablesbar. Bei der Glo I fiel unter diesen Bedingungen die unterschiedliche Wanderungsstrecke der Proteine auf (8-13 cm vom Auftragungsort) und das insgesamt breit ausgezogene Bandenmuster. Die Auftrennung der EsD änderte sich unter den verschiedenen Elektrophoresebedingungen, wahrscheinlich auf Grund ihrer geringen Wanderstrecke (4-5 cm), vergleichsweise wenig.

Modifikationen des Färbenachweises

Die enzymatischen Färbenachweise wurden wie unter "Material und Methoden" beschrieben durchgeführt. Bei der EsD-Fluoreszenzfärbung nach HOPKINSON et al. (1973) genügt es hierbei, die Gelscheiben direkt mit der Reaktionslösung zu übergießen und unter UV-Licht (350 nm) sichtbar zu machen. Eine längere Inkubation in Filterpapierblättern ist nicht mehr erforderlich. Alternativ wurde die Glo I nach der Methode von KÖMPF et al. (1975) angefärbt. Im Vergleich dazu führte bei diesen Untersuchungen die Darstellung der Enzymaktivität durch Jod-Agar-Overlay nach PARR et al. (1977) zu deutlich besseren Ergebnissen. Eine Verkürzung der Inkubationszeit auf 25-30 Minuten (vgl. PARR et al. (1977): 40 Minuten Inkubation) begünstigte hierbei eine klare Abgrenzung der Banden.

Lagerungsstabilität der untersuchten Enzyme

Die Stabilität der Proteine wurde unter verschiedenen Lagerungsbedingungen getestet. Eine Aufbewahrung der toluolbehandelten Blutproben bei +4°C im Kühlschrank für 24 Stunden führte zu keiner Verschlechterung der Nachweisbarkeit gegenüber frisch aufgearbeiteten Proben. Bei längerer Lagerung erwies sich besonders die Glo I als relativ instabil. Unter gleichen Elektrophorese- und Färbebedingungen änderte sich das Bandenmuster im Vergleich zu frischen Hämolysaten: die Banden wurden im allgemeinen diffus und folglich nicht mehr deutlich ablesbar. Dieses Phänomen zeigte sich besonders bei den drei Banden der heterozygoten Phänotypen, die dann ohne klare Abgrenzung ineinander übergingen. Auch ein Tiefgefrieren der Hämolysate bei -18°C für 2-3 Wochen führte zu einer deutlichen Einbuße der Enzymaktivität. Im Vergleich zur instabilen Glo I (vgl. auch MARTIN et al., 1976) erwiesen sich die GOT_M und die EsD unter den genannten Bedingungen als stabiler. Bei allen Untersuchungen zeigte die EsD von den drei Enzymsystemen die größte Lagerungsstabilität.
Um mehrmaliges Auftauen tiefgefrorener Proben und den damit verbundenen Aktivitätsverlust zu vermeiden, wurden Aliquots (100-200 µl) der Proben getrennt eingefroren.

Einfluß der Enzymkonzentration und Ionenstärke auf die Proteintrennung

Bekanntlich beeinflussen die Enzymkonzentration und die Ionenstärke der Proben die Proteintrennung. Besonders bei der Typisierung der GOT_M fiel auf, daß sich die Enzymbanden trotz optimaler Trennbedingungen bei verschiedenen Proben nicht immer in gleicher Intensität darstellen ließen. Von relativ schwacher Zeichnung bis hin zu intensiven, teilweise kathodenwärts dreieckförmig auslaufenden Banden wurden alle Übergänge beobachtet. Dieses Phänomen, das keine eindeutige Identifizierung zuließ, konnte durch Versetzen der entsprechenden Proben mit destilliertem Wasser in aufsteigender Verdünnung (1:2, 1:3, 1:4, v/v) ausgeschlossen werden. Ferner wurde durch Verdoppelung des Probenvolumens (200 µl statt 100 µl) die Frage angegangen, ob ein Zusammenhang zwischen der Intensität der Banden und der Menge des applizierten Hämolysates besteht. Jedoch wurden mit dieser Modifikation keine besseren Ergebnisse erzielt.
Die Darstellung der Glo I und der EsD hingegen wurde durch die Veränderung der Enzymkonzentration wenig beeinflußt.

Polymorphismus der Enzymsysteme EsD, Glo I und GOT_M

In jedem der untersuchten Enzymsysteme wurden drei Phänotypen gefunden (vgl. zur Übersicht HOPKINSON et al., 1973; KÖMPF et al., 1975; DAVIDSON et al., 1970).

Esterase D

Unter den vorgegebenen Trennbedingungen liegen die Proteinbanden der EsD 4-5 cm anodenwärts vom Auftragungsort entfernt. Dabei stellt sich der EsD 1-Phänotyp als einzelne, langsam anodisch wandernde Bande dar. Er unterscheidet sich durch seine geringere elektrophoretische Mobilität von der mit gleicher Intensität fluoreszierenden Bande des Phänotyps EsD 2. Der heterozygote Phänotyp EsD 2-1 besteht aus drei Banden. Zwischen zwei schwächer fluoreszierenden Banden im Bereich der Phänotypen EsD 1 und EsD 2 stellt sich eine Intermediärbande mit stärkerer Fluoreszenz dar, wie aus den Abbildungen 7 und 8 ersichtlich.

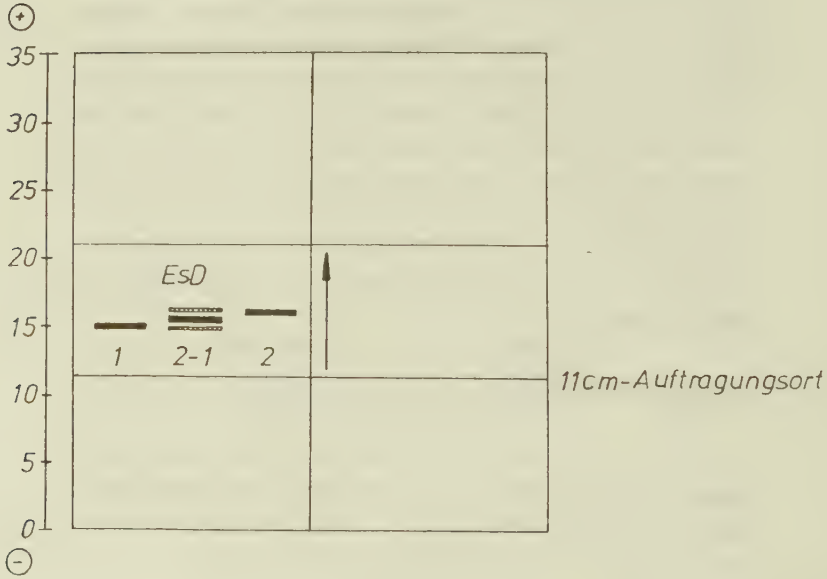


Abb.7: Typisierung der Enzymbanden der Esterase D

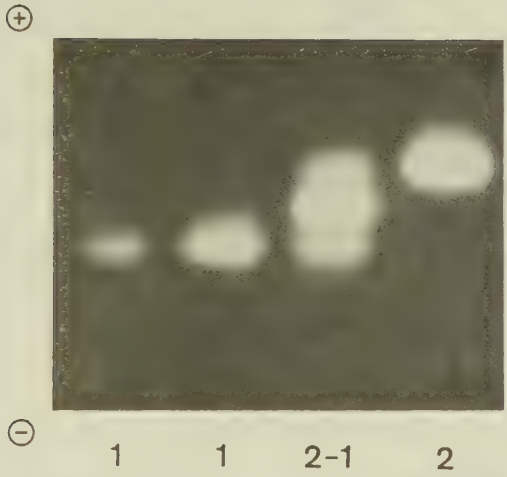


Abb.8: Photographische Darstellung der EsD-Phänotypen nach horizontaler Stärkegelelektrophorese und enzymatischem Färbenachweis (UV-Licht, 350 nm)

Glyoxalase I

Die Enzymbanden der Glo I wandern weiter anodisch (8-13 cm) und sind dadurch gut vom EsD-System getrennt. Auch hier sind drei Phänotypen zu unterscheiden, wobei der weiter anodenwärts wandernde homozygote Phänotyp "Glo 2" benannt wird. Insgesamt sind die Banden der Glo I breiter und zeigen nach der Farbreaktion gleiche Intensität.
In den Abbildungen 9 und 10 ist die Auftrennung der Phänotypen im Stärkegel dargestellt.

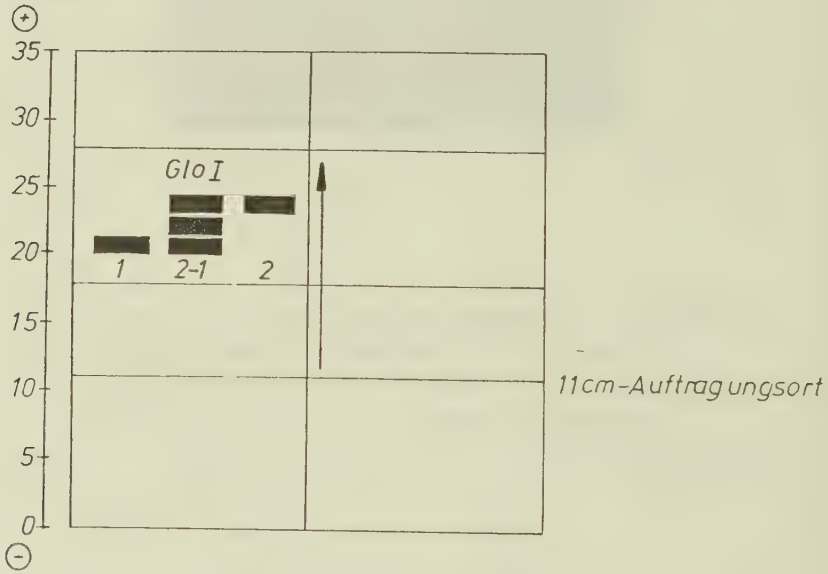


Abb.9: Typisierung der Enzymbanden der Glyoxalase I

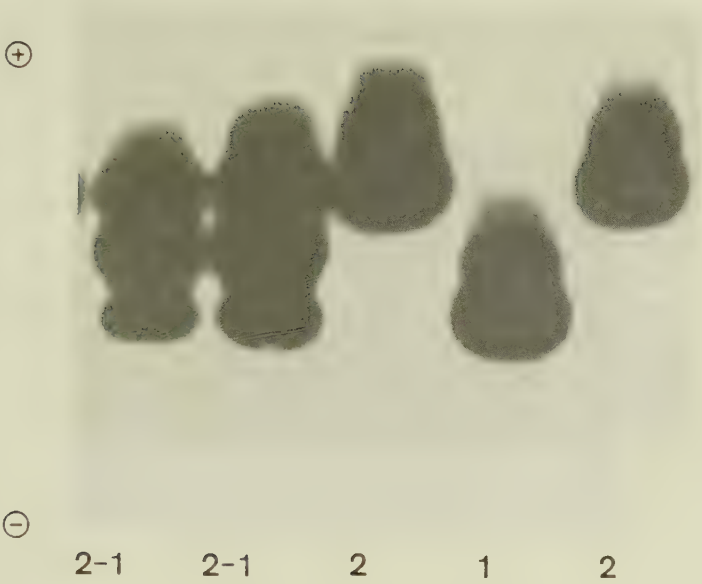


Abb.10: Photographische Darstellung der Glo I-Phänotypen nach horizontaler Stärkegel-elektrophorese und enzymatischem Färbenachweis

Glutamat-Oxalacetat-Transaminase $_M$

Im Gegensatz zur zytosolischen GOT_S (wandert unter den gegebenen Bedingungen anodisch) wird die GOT_M, das mitochondrielle Isoenzym der GOT, 3-4 cm vom Auftragungsort in Richtung der Kathode getrennt. Dies ermöglicht eine gute Typisierung ohne Überlagerung der beiden anderen Enzymsysteme. Der Phänotyp GOT_M 1 unterscheidet sich von dem seltenen homozygoten GOT_M 2 Typ durch seine größere elektrophoretische Mobilität in Richtung der Kathode. Der heterozygote Phänotyp GOT_M 2-1 zeichnet sich wiederum durch ein Drei-Banden-Muster aus, wobei die 2er-Bande charakteristischerweise intensiver ausgeprägt ist als die 1er- und Intermediärbande. Der seltene homozygote Phänotyp GOT_M 2 ist in Relation zu GOT_M 1 und GOT_M 2-1 in den Abbildungen 11 und 12 dargestellt.

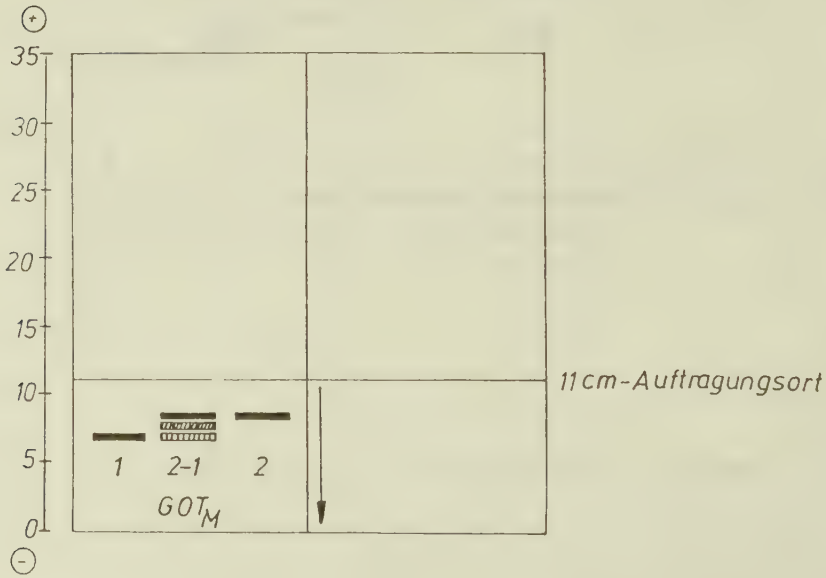


Abb.11: Typisierung der Enzymbanden der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase $_M$

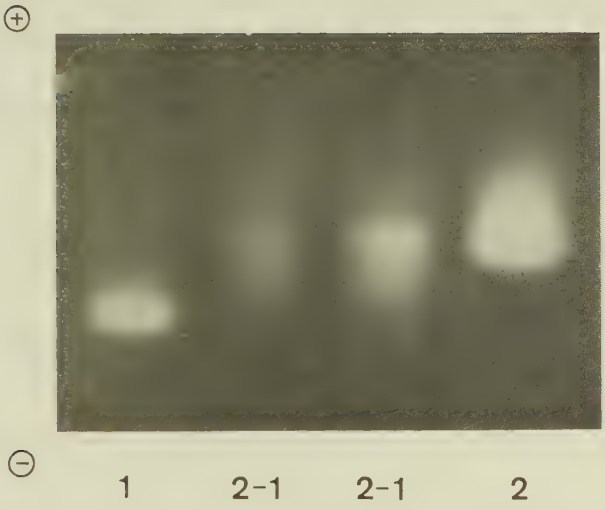


Abb.12: Photographische Darstellung der GOT_M-Phänotypen nach horizontaler Stärkegelelektrophorese und enzymatischem Färbenachweis

Genotypen-Verteilung und Genfrequenzen der EsD, Glo I und GOT_M im Düsseldorfer Raum

In Tabelle 1 ist die Genotypen-Verteilung der Enzymsysteme Esterase D, Glyoxalase I und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase $_M$ im Düsseldorfer Raum wiedergegeben. Unter Annahme von Hardy-Weinberg-Bedingungen wurden für die drei Enzyme die Erwartungswerte berechnet und den Beobachtungswerten vergleichend gegenübergestellt.

Genotyp		EsD	Glo I	GOT_M
1-1	beob.	321	76	297
	erw.	323,59	78,32	296,15
2-1	beob.	90	202	12
	erw.	84,84	197,36	13,69
2-2	beob.	3	122	1
	erw.	5,56	124,32	0,16
n (Stichprobenumfang)		414	400	310

Tab.1: Beobachtungs- und Erwartungswerte der Genotypen der Enzyme EsD, Glo I und GOT_M im Düsseldorfer Raum

Für die Glo I wurde unter Anwendung des χ^2-Testes bei $d_f=1$ eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $0,7 > p > 0,5$ ermittelt (vgl. Sachs, 1969).

Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, stimmen Beobachtungs- und Erwartungswerte in allen drei Systemen gut überein.
Nach den unter "Material und Methoden" angegebenen Gleichungen wurden die Genfrequenzen für die EsD, Glo I und GOT_M berechnet. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Esterase D:	$EsD^1 = 0{,}8841$
	$EsD^2 = 0{,}1159$
Glyoxalase I:	$Glo^1 = 0{,}4425$
	$Glo^2 = 0{,}5575$
Glutamat-Oxalacetat-Transaminase$_M$:	$GOT_M{}^1 = 0{,}9774$
	$GOT_M{}^2 = 0{,}0226$

Tab.2: Genfrequenzen der EsD, Glo I und GOT_M im Düsseldorfer Raum

In der untersuchten Stichprobe liegt die Genfrequenz für das Gen EsD^1 deutlich höher gegenüber EsD^2. Die beiden Allele des Glo I-Systems kommen in annähernd gleicher Häufigkeit vor. Im Falle der GOT_M wurde der homozygote Phänotyp GOT_M 2 nur einmal beobachtet. Das Gen $GOT_M{}^2$ kann als ein seltenes Allel aufgefaßt werden.

DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden die drei Enzymsysteme Esterase D, Glyoxalase I und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase $_M$ in Coelektrophorese aus menschlichen Blutzellen dargestellt. Während die EsD und die Glo I wegen ihrer hohen Konzentrationen in Erythrozyten aus toluolbehandelten und somit stromafreien Hämolysaten nachgewiesen werden konnten, gelang die gesicherte Darstellung der GOT_M unter diesen Voraussetzungen nicht. Erst nach Anreicherung von Leukozyten, die bekanntlich Mitochondrien und somit die GOT_M enthalten, konnte eine klare Bandenzeichnung dieses Enzyms erreicht werden. Im Vergleich mit der Ficoll-Methode zur Isolation von Blutzellen wird mit der hier angewendeten Technik lediglich eine Anreicherung von Leukozyten, aber keine Isolierung bzw. Differenzierung der leukozytären Zellelemente erzielt. Dieses vereinfachte Vorgehen zum Nachweis der GOT_M erscheint besonders für Routineuntersuchungen geeignet, bei denen eine möglichst schnelle und schonende Aufarbeitung der Blutzellen angestrebt wird.
Unter den genannten Elektrophoresebedingungen fielen bei der Darstellung der Glo I, verglichen mit den beiden anderen Systemen, eine größere Wanderungsstrecke und ein breiter ausgezogenes Bandenmuster auf. Dieses Phänomen ist bedingt durch die Feldstärke und Laufzeit der Elektrophorese (9 Volt/cm, 18-20 Stunden), die im Vergleich zu den von KÖMPF et al. (1975) gewählten Konditionen (7,5 Volt/cm, 14 Stunden) deutlich höher liegen. Diese waren jedoch Voraussetzung für eine klare Auftrennung der GOT_M,

die besonders bei verminderter Spannung unter unseren Bedingungen nicht mehr gewährleistet war.
Untersuchungen zur Stabilität der Enzyme unter verschiedenen Lagerungsbedingungen ergaben, daß besonders die Glo I relativ instabil ist. Gealterte Proben zeigten ein diffuses Bandenmuster und waren folglich nicht mehr exakt typisierbar. MARTIN et al. (1976) beschreiben unter Hinweis auf die Lagerungslabilität der Glo I einen Aktivitätsverlust des Enzyms und das Auftreten weiterer Banden bei Verwendung von 2-3 Tage alten Hämolysaten. Nach KÜHNL et al. (1977) kann es im Falle gealterter Proben zur Fehldeutung eines verbreiterten und anodisch verzogenen Glo-1-Phänotyps als heterozygoter Glo 2-1-Typ kommen. Ähnliche Phänomene konnten auch bei wiederholt aufgetragenen Hämolysaten beobachtet werden. Im Interesse einer exakten Phänotypen-Bestimmung wurden deshalb frisch aufgearbeitete Blute eingesetzt.
Dennoch ließen sich die Enzymbanden nicht immer in gleicher Intensität darstellen, was besonders bei der Typisierung der GOT_M auffiel. Möglicherweise sind diese Differenzen zurückzuführen auf die individuell unterschiedlichen Leukozytenanteile in den einzelnen Blutproben. Bei der Leukozytenanreicherung ist der Anteil der weißen Blutzellen am Gesamthämolysat nicht standardisierbar, so daß die Enzymkonzentrationen der Proben innerhalb bestimmter Grenzen differieren. Durch aufsteigende Verdünnung der entsprechenden Hämolysate konnte dieser Einfluß weitgehend ausgeschlossen werden. Andererseits ist zu erwägen, daß es sich auch um genetisch verankerte, interindividuelle Unterschiede der Enzymaktivitäten handeln kann.

Im folgenden soll diskutiert werden, ob unterschiedliche Genverteilungsmuster der drei Enzymsysteme innerhalb der Bundesrepublik Deutschland als populationsgenetisch bedingte Differenzen erklärt werden können. Dazu werden die eigenen Ergebnisse den Daten anderer Untersucher aus dem bundesdeutschen Raum vergleichend gegenübergestellt.
In Tabelle 3 sind die Genfrequenzen der Esterase D aus verschiedenen Gegenden der Bundesrepublik Deutschland mit abnehmender Häufigkeit des Gens EsD^1 aufgelistet.

Untersucher	Raum	Genfrequenzen EsD 1	Genfrequenzen EsD 2	n
HEIDE, 1976	Schleswig-H.	0,9026	0,0974	1088
GRÜNER et al., 1978	Norddeutschl.	0,8935	0,1065	2028
°RITTNER et al., 1975	Bonn	0,8897	0,1094	562
°BENDER et al., 1974	Südwest-D.	0,8892	0,1081	185
BRINKMANN et al., 1978	Hamburg	0,8892	0,1108	1430
KÜHNL et al., 1974	Hessen	0,8882	0,1118	510
KÖHLER, 1978	Schleswig-H.	0,8879	0,1121	1111
HENNE et al., 1979	Hamburg	0,8872	0,1128	1980
MARTIN et al., 1975	Berlin	0,8835	0,1165	545
KÖSTER, 1975	Köln	0,8831	0,1169	1082
BENKMANN et al., 1974	Norddeutschl.	0,8824	0,1176	408
+HENKE, BIEROTTE, 1981	Düsseldorf	0,8754	0,1246	1561
°WIEBECKE, 1976	Nordbayern	0,8737	0,1261	2530

Tab.3: Vergleich der Genfrequenzen der Esterase D in der Bundesrepublik Deutschland
n gibt den Stichprobenumfang, d.h. die Zahl der untersuchten Proben an

° In diesen Untersuchungen wurde ein Phänotyp EsD 3-1 beobachtet und in die Berechnung der Genfrequenzen mit einbezogen.

+ Die Genfrequenzen aus dem Raum Düsseldorf ergaben sich unter Zusammenfassung eigener Untersuchungs-

ergebnisse (n = 414, vgl. S.28f.) und der Auswertung der Typisierungsunterlagen (1978 bis 1981) von Dr. J. Henke, Institut für Rechtsmedizin der Universität Düsseldorf (Lehrstuhl Prof. Dr. H. Schweitzer). Bei dieser Auswertung wurden folgende Genfrequenzen ermittelt:
EsD^1 = 0,8723 EsD^2 = 0,1277 n = 1147.
Die Genfrequenzen beider Kollektive zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, zeigen die ermittelten Genfrequenzen keine extremen Abweichungen. Die Häufigkeiten für das Gen EsD^1 liegen zwischen 0,9026 und 0,8737, entsprechend einer maximalen Differenz von 0,0289. Die Prüfung nach χ^2 (d_f=1, $p < 0,05$) ergab statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen von WIEBECKE (Nordbayern) gegenüber HEIDE (Schleswig-Holstein), GRÜNER et al. (Norddeutschland) und BRINKMANN et al. (Hamburg) sowie zwischen den Angaben von HEIDE gegenüber KÖSTER (Köln). Die Untersuchung aus dem Düsseldorfer Raum zeigt signifikante Abweichungen zu den Daten von HEIDE, GRÜNER et al., BRINKMANN et al., KÖHLER (Schleswig-Holstein) und HENNE et al. (Hamburg).

Mit der hier gewählten Methode der Stärkegelelektrophorese kann der heterozygote Phänotyp EsD 2-1 nicht sicher vom seltenen Phänotyp EsD 5-1 (Genfrequenz EsD^5 = 0,014 nach MARTIN et al., 1979) unterschieden werden. Wie eine erst kürzlich veröffentlichte Untersuchung von OLAISEN et al. (1981) zeigt, ist eine klare Differenzierung beider Phäno-

typen jedoch mit der isoelektrischen Fokussierung (IEF) möglich. Es scheint daher zukünftig sinnvoll, alle in der Stärke- oder Agarosegelelektrophorese typisierten EsD 2-1 und EsD 2 Phänotypen mittels der IEF-Methode zusätzlich abzusichern.

In Tabelle 4 sind die aus dem westdeutschen Raum vorliegenden Genfrequenzen der Glyoxalase I vergleichend zusammengestellt.

Untersucher	Raum	Genfrequenzen Glo ^{1}	Glo ^{2}	n
MAUFF et al., 1978	Köln	0,4512	0,5488	1075
+HENKE, BIEROTTE, 1981	Düsseldorf	0,4507	0,5493	1472
KÜHNL et al., 1977	Hessen	0,4391	0,5609	1150
RACKWITZ et al., 1981	Berlin	0,4350	0,5649	3278
KÖMPF et al., 1975	Südwest-D.	0,427	0,573	655
BERG et al., 1977	Süddeutschl.	0,4235	0,5765	1025
BRINKMANN et al., 1978	Hamburg	0,4145	0,5855	865
MARTIN et al., 1976	Berlin	0,3768	0,6232	548

Tab.4: Vergleich der Genfrequenzen der Glyoxalase I in der Bundesrepublik Deutschland
n gibt den Stichprobenumfang, d.h. die Zahl der untersuchten Proben an

+ Die Genfrequenzen aus dem Raum Düsseldorf ergaben sich unter Zusammenfassung eigener Untersuchungs-

ergebnisse (n = 400, vgl. S.28f.) und der Auswertung der Typisierungsunterlagen (1978 bis 1981) von Dr. J. Henke, Institut für Rechtsmedizin der Universität Düsseldorf (Lehrstuhl Prof. Dr. H. Schweitzer). Bei dieser Auswertung wurden folgende Genfrequenzen ermittelt:
Glo^1 = 0,4538 Glo^2 = 0,5462 n = 1072.
Die Genfrequenzen beider Kollektive zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Die Genfrequenzen für das Gen Glo^1 liegen zwischen 0,4512 und 0,3768 mit einer im Vergleich zur Esterase D größeren maximalen Differenz von 0,0744. Diese ist zurückzuführen auf das Ergebnis der Berliner Untersuchung von MARTIN et al., das um 0,0576 von dem aus den anderen Genfrequenzen errechneten Mittelwert abweicht. Der χ^2-Test ergab statistisch signifikante Unterschiede der Berliner Stichprobe zu allen übrigen Untersuchungen (vgl.auch KÜHNL et al., 1977). Eine Signifikanz wurde außerdem zwischen der Studie von MAUFF et al. (Köln) gegenüber BRINKMANN et al. (Hamburg) gefunden. Die Untersuchung aus dem Düsseldorfer Raum zeigt signifikante Abweichungen zu den Daten von MARTIN et al., BRINKMANN et al., BERG et al., KÖMPF et al. und RACKWITZ et al., stimmt hingegen gut überein mit den im Kölner Raum ermittelten Genfrequenzen.

Tabelle 5 gibt die vorliegenden Angaben zur Genverteilung der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase $_M$ im westdeutschen Raum wieder.

Untersucher	Raum	Genfrequenzen GOT_M^1	Genfrequenzen GOT_M^2	n
ANANTHAKRISHNAN et al., 1972	Mainz	0,9927	0,0073	204
RITTER et al., 1979	Südwest-D.	0,981	0,019	640
BIEROTTE, 1981	Düsseldorf	0,9774	0,0226	310

Tab.5: Vergleich der Genfrequenzen der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase $_M$ in der Bundesrepublik Deutschland
n gibt den Stichprobenumfang, d.h. die Zahl der untersuchten Proben an

Die eigenen Ergebnisse stimmen mit den von RITTER et al. ermittelten Genfrequenzen gut überein. Die Prüfung der drei Studien nach dem χ^2-Test ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Der Vergleich der Genverteilungen der vorliegenden Untersuchungen läßt den Schluß zu, daß die Genfrequenzen für die EsD, Glo I und GOT_M aus dem Düsseldorfer Raum als weitgehend repräsentativ für die Bundesrepublik Deutschland angesehen werden können.

Zahlreiche Studien über die hier untersuchten Enzympolymorphismen wurden vergleichend an Populationen verschiedener Rassen und ethnischer Gruppen vorgenommen. In Tabelle 6 sind einige dieser populationsgenetischen Daten zur Esterase D-Verteilung zusammengestellt (vgl. PAPIHA et al., 1977).

Population	Referenz	EsD^1	n
Europäer insg.	HOPKINSON et al., 1973	0,902	867
italien. Alpen	PAPIHA et al., 1977	0,950	90
Lappland	WELCH et al., 1974	0,757	136
Negride insg.	HOPKINSON et al., 1973	0,902	102
Gambia	WELCH et al., 1974	0,916	734
Japan (Tokio)	OMOTO et al., 1975	0,658	1066
Tibet	PAPIHA et al., 1977	0,592	144

Tab.6: EsD-Genfrequenzen verschiedener Populationen

Für den Glo I-Polymorphismus liegt bisher eine geringere Zahl populationsgenetischer Daten vor. Nach BRINKMANN et al. (1978) streuen die Angaben für das Gen Glo^1 in europäischen Populationen zwischen 0,38 und 0,46; deutlich geringer dagegen sei die Häufigkeit von Glo^1 bei Negriden (0,28) und bei Lappen (0,30).

Zur GOT_M-Genverteilung in verschiedenen Bevölkerungsgruppen wird Bezug genommen auf eine vergleichende Studie von HACKEL et al. (1972). Sie ermittelten eine GOT_M^1-Frequenz für Europäer von 0,983, für Negride von 0,925.

Dieser Überblick zeigt erwartungsgemäß, daß die Genverteilungen in den verschiedenen ethnischen Gruppen teilweise stark differieren. Diese Unterschiede scheinen populationsgenetisch bedingt zu sein. Jedoch

sollte bei der Wertung einer vergleichenden Zusammenstellung von Genfrequenzen berücksichtigt werden, daß auch Umfang und Wahl der Stichprobe möglicherweise die Ergebnisse beeinflussen.

Die vorliegende Studie zur Phänotypen-Verteilung der Enzymsysteme Esterase D, Glyoxalase I und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase $_M$ im Düsseldorfer Raum ist nicht zuletzt von Interesse im Hinblick auf Identitäts- und Vaterschaftsbegutachtungen. Aus den Genfrequenzen eines bestimmten Raumes kann die theoretische Wahrscheinlichkeit für einen Vaterschaftsausschluß berechnet werden. Die isolierte Vaterschaftsausschlußchance (SACHS, 1969) innerhalb der untersuchten Population beträgt für den EsD-Polymorphismus 0,0972, d.h. theoretisch könnten 9,7% beklagter Nichtväter allein auf Grund ihres EsD-Merkmals von der Vaterschaft ausgeschlossen werden. Für den Glyoxalase I-Polymorphismus ergibt sich eine Ausschlußchance von 0,1863, entsprechend 18,6%, während die Vergleichswerte der GOT_M bei 0,0216, entsprechend 2,16%, liegen. Bekanntlich nimmt die Sicherheit eines Ausschlusses mit der Zahl der untersuchten Systeme zu. Sind die Voraussetzungen einer zuverlässigen Phänotypen-Bestimmung und eines gesicherten Erbgangs erfüllt, wie für die drei Enzyme EsD, Glo I und GOT_M nach den bisher vorliegenden Ergebnissen angenommen werden kann, bietet die Serogenetik ein wichtiges Entscheidungskriterium in der Vaterschaftsbegutachtung.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Enzymsysteme Esterase D, Glyoxalase I und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase $_M$ in der Stärkegelelektrophorese hinsichtlich ihrer Polymorphismen bestimmt. Für die einzelnen Enzyme wurden unverwandte Individuen aus dem Düsseldorfer Raum untersucht (EsD: 1561, Glo I: 1472, GOT_M: 310).

Folgende Genfrequenzen wurden ermittelt:

EsD ^{1}: 0,8754	EsD ^{2}: 0,1246
Glo ^{1}: 0,4507	Glo ^{2}: 0,5493
$GOT_M{}^1$: 0,9774	$GOT_M{}^2$: 0,0226

Die gefundenen Genfrequenzen wurden mit entsprechenden Untersuchungsergebnissen anderer Populationen vergleichend diskutiert.

LITERATURVERZEICHNIS

Ananthakrishnan, R., Beck, W. & Walter, H.
Polymorphism of mitochondrial glutamic oxalo-acetic transaminase in a German population
Humangenetik 17, 89-90 (1972)

Bargagna, M., Domenici, R. & Morali, A.
Red cell esterase-D polymorphism in the population of Tuscany
Humangenetik 29, 251-253 (1975)

Bender, K. & Frank, R.
Esterase D-Polymorphismus: Darstellung in der Hochspannungselektrophorese und Mitteilung von Allelhäufigkeiten
Humangenetik 23, 315-318 (1974)

Bender, K. & Grzeschik, K.-H.
Assignment of the genes for human glyoxalase I to chromosome 6 and for human esterase D to chromosome 13
Cytogenet. Cell Genet. 16, 93-96 (1976)

Benkmann, H.-G. & Goedde, H.W.
Esterase D polymorphism: gene frequencies and family data
Humangenetik 24, 325-327 (1974)

Berg, K., Rodewald, A., Schwarzfischer, F. & Wischerath, H.
Population genetics of glyoxalase I (E.C.4.4.1.5.) in human erythrocytes
Z. Rechtsmed. 79, 13-15 (1977)

Berg, K., Schwarzfischer, F. & Wischerath, H.
Esterase D polymorphism: description of the "new" allele EsD^4
Hum. Genet. 32, 81-83 (1976)

Bergmeyer, H.-U.
Methoden der enzymatischen Analyse, Bd 1
Verlag Chemie Weinheim / Bergstr. (1974)

Brinkmann, B. & Püschel, K.
Forensischer Anwendungsbereich und Populationsgenetik der Enzympolymorphismen Esterase D und Glyoxalase I
Z. Rechtsmed. 81, 181-190 (1978)

Chen, S.-H. & Giblett, E.R.
Genetic variation of soluble glutamic-oxaloacetic transaminase in man
Amer. J. Hum. Genet. 23, 419-424 (1971)

Cohen, P.P. & Sober, E.K.
Glyoxalase activity of erythrocytes from cancerous rats and human subjects
Cancer Res. 5, 631-632 (1945)

Davidson, R.G., Cortner, J.A. & Rattazzi, M.C.
Genetic polymorphisms of human mitochondrial glutamic oxaloacetic transaminase
Science 169, 391-392 (1970)

Fleisher, G.A., Potter, C.S. & Wakim, K.G.
Separation of two glutamic-oxalacetic transaminases by paper electrophoresis
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 103, 229-231 (1960)

Grüner, O. & Simeoni, E.
Polymorphismus der menschlichen Erythrozyten-Esterase D
Z. Rechtsmed. 81, 261-267 (1978)

Guilbault, G.G.
Handbook of enzymatic methods of analysis
(Clinical and biochemical analysis, Vol.4)
Marcel Dekker, Inc. (1976)

Hackel, E., Hopkinson, D.A. & Harris, H.
Population studies on mitochondrial glutamate-oxaloacetate transaminase
Ann. Hum. Genet. 35, 491-496 (1972)

Harris, H.
Biochemische Grundlagen der Humangenetik
Akademie-Verlag, Berlin (1974)

Harris, H.
Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics
Supplement 1977

Harris, H., Hopkinson, D.A. & Robson, E.B.
The incidence of rare alleles determining electrophoretic variants: data on 43 enzyme loci in man
Ann. Hum. Genet. 37, 237-253 (1974)

Heide, K.-G.
Esterase D Polymorphismus: Phänotypenverteilung und Genfrequenzen in Norddeutschland (Schleswig-Holstein)
Z. Rechtsmed. 77, 295-298 (1976)

Henne, D. & Brinkmann, B.
Neuere Daten zum Enzympolymorphismus der Esterase D
Ärztl. Lab. 25, 215-218 (1979)

Heyningen, V. van, Bobrow, M., Bodmer, W.F., Povey, S., Gardiner, S.E. & Hopkinson, D.A.
Assignment of the genes for human mitochondrial malate dehydrogenase to chromosome 7, for mannose phosphate isomerase and pyruvate kinase to chromosome 15, and, probably, for human esterase-D to chromosome 13 using man-mouse hybrids
in: Rotterdam Conference (1974): Second international workshop on human gene mapping. Birth defects: Original Article Series, Vol.11, No.3, 183-187 (The National Foundation, New York 1975)

Hopkinson, D.A., Mestriner, M.A., Cortner, J. & Harris, H.
Esterase D: a new polymorphism
Ann. Hum. Genet. 37, 119-137 (1973)

Hunter, R.L. & Markert, C.L.
Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels
Science 125, 1294 (1957)

Köhler, H.-W.
Genetische Untersuchungen über die Erythrozyten-Esterase D
Diss., Kiel (1978)

Kömpf, J., Bissbort, S., Gussmann, S. & Ritter, H.
Polymorphism of red cell glyoxalase I (E.C.: 4.4.1.5.). A new genetic marker in man
Humangenetik 27, 141-143 (1975)

Kömpf, J. & Bissbort, S.
Population genetics of red cell glyoxalase I (E.C.: 4.4.1.5.). Gene frequencies in Southwestern Germany
Humangenetik 28, 175-176 (1975)

Köster, B., Leupold, H. & Mauff, G.
Esterase D polymorphism: High-voltage agarose-gel electrophoresis and distribution of phenotypes in different European populations
Humangentik 28, 75-78 (1975)

Koziol, P. & Stepien, J.
Atypical segregation of esterase D: Evidence of a rare "silent" allele EsD^{O}
Hum. Genet. 53, 223-225 (1980)

Kühnl, P., Nowicki, L. & Spielmann, W.
Untersuchungen zum Polymorphismus der intraerythrocytären Esterase D (EsD) mittels Hochspannungselektrophorese auf Agarosegel
Z. Rechtsmed. 75, 179-182 (1974)

Kühnl, P., Schwabenland, R. & Spielmann, W.
Investigations on the polymorphism of glyoxalase I (E.C.4.4.1.5.) in the population of Hessen, Germany
Hum. Genet. 38, 99-106 (1977)

Mannervik, B., Lindström, U. & Bartfai, T.
Partial purification and characterization of glyoxalase I from porcine erythrocytes
Europ. J. Biochem. 29, 276-281 (1972)

Manucci, P.M. & Dioguardi, N.
Electrophoretic characterization of glutamic oxal-acetic transaminase in human red cells of different ages
Clin. Chim. Acta 14, 215-218 (1966)

Markert, C.L. & Möller, F.
Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species specific patterns
Proc. nat. Acad. Sci. (U.S.) 45, 753 (1959)

Marks, M.P., Jenkins, T. & Nurse, G.T.
The red-cell glutamic-pyruvate transaminase, carbonic anhydrase I and II and esterase D polymorphisms in the Ambo populations of South West Africa, with evidence for the existence of an EsD^{O} allele
Hum.Genet. 37, 49-54 (1977)

Martin, W.
Neue Elektrophoresemethoden zur Darstellung von Serum- und Enzympolymorphismen: technische Verbesserungen, Hinweis auf weiteres EsD-Allel
Ärztl. Lab. 25, 65-67 (1979)

Martin, W. & Ott, A.
Polymorphismus der menschlichen Erythrozyten-Esterase D. Phänotypenverteilung und Genfrequenzen in Berlin (West)
Blut 30, 299-301 (1975)

Martin, W. & Ott, A.
Zur Darstellung der Glyoxalase I unter besonderer Berücksichtigung der Instabilität des Enzyms
Ärztl. Lab. 22, 293-295 (1976)

Mauff, G., Wachauf, P., Schaal, K.P. & Pulverer, G.
Glo I and Bf phenotype distribution in a West German population sample
Hum. Hered. 28, 431-434 (1978)

Olaisen, B., Siverts, A., Jonassen, R., Mevag, B. & Gedde-Dahl, T.
The ESD polymorphism: further studies of the ESD 2 and ESD 5 allele products
Hum. Genet. 57, 351-353 (1981)

Omoto, K., Aoki, K. & Harada, S.
Polymorphism of esterase D in some population groups in Japan
Hum. Hered. 25, 378-381 (1975)

Papiha, S.S. & Nahar, A.
The world distribution of the electrophoretic variants of the red cell enzyme esterase D
Hum. Hered. 27, 424-432 (1977)

Parr, C.W., Bagster, I.A. & Welch, S.G.
Human red cell glyoxalase I polymorphism
Biochem. Genet. 15, 109-113 (1977)

Racker, E.
The mechanism of action of glyoxalase
J. Biol. Chem. 190, 685 (1951)

Rackwitz, A. & Haase, P.
Glo-Frequenzen in Berlin
Krim. u. Forens. Wiss. 43, 51ff. (1981)

Radam, G., Strauch, H. & Martin, W.
Der Phänotyp "Rügen" im Polymorphismus der Esterase D: Hinweis auf die Existenz eines neuen Allels (EsD^{6})
Blut 40, 337-341 (1980)

Ranzani, G., Antonini, G. & Santachiara-Benerecetti, A.S.
Red cell glyoxalase I polymorphism in Italians. Report of a variant phenotype
Hum. Hered. 29, 261-264 (1979)

Ritter, H. & Kömpf, J.
Human mitochondrial glutamic-oxaloacetic-transaminase, GOT_M: Formal genetics
Hum. Genet. 51, 327-329 (1979)

Rittner, C. & Müller, G.
Esterase D: Some population and formal genetical data
Hum. Hered. 25, 152-155 (1975)

Rittner, C. & Weber, W.
Evidence for a "silent allele" Glo^{o} at the glyoxalase I locus
Hum. Genet. 42, 315-318 (1978)

Rubinstein, P. & Suciu-Foca, N.
Glyoxalase 1: A possible "null" allele
Hum. Hered. 29, 217-220 (1979)

Sachs, L.
Statistische Auswertungsmethoden
2.Auflage, 1969, 138ff.

Sparkes, R.S., Sparkes, M.C. & Crist, M.
Expression of esterase D and other gene markers in trisomy 13
Hum. Genet. 52, 179-183 (1979)

Sparkes, R.S., Targum, S., Gershon, E., Sensabaugh, G.F., Sparkes, M.C. & Crist, M.
Evidence for a null allele at the esterase D (E.C.3.1.1.1.) locus
Hum. Genet. 46, 319-323 (1979)

Szent Györgyi, A., Együd, U.G. & Mc Laughlin, J.A.
Keto-aldehydes and cell division. Glyoxal derivatives may be regulators of cell division and open a new approach to cancer
Science 155, 539-541 (1967)

Tashian, R.E.
Multiple forms of esterases from human erythrocytes
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 108, 364 (1961)

Tashian, R.E.
The esterases and carbonic anhydrases in human erythrocytes
in: Biochemical Methods in Red Cell Genetics (ed. J.J. Yunis), pp. 307-336 (1969)
New York and London: Academic Press

Valentine, W.N. & Tanaka, K.R.
The glyoxalase content of human erythrocytes and leucocytes
Acta Haematol. 26, 303 (1961)

Wada, H. & Morino, Y.
Comparative studies on glutamic-oxalacetic transaminases from the mitochondrial and soluble fractions of mammalian tissues
Vitam. Horm. 22, 411-444 (1964)

Welch, S. & Lee, J.
The population distribution of genetic variants of human esterase D
Humangenetik 24, 329-331 (1974)

Wiebecke, D.
Untersuchungen zum Polymorphismus der menschlichen erythrozytären Esterase D
Blut 33, 329-331 (1976)

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. G. Röhrborn, Direktor des Instituts für Humangenetik und Anthropologie der Universität Düsseldorf, danke ich für die wissenschaftliche und technische Unterstützung, diese Arbeit an seinem Institut erstellen zu können.

Herrn Prof. Dr. H. Schweitzer, Direktor des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Düsseldorf, danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Dr. A.J. Driesel danke ich für die wissenschaftliche Betreuung, sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und zahlreiche Diskussionen, die mir bei der Durchführung der Versuche und der schriftlichen Niederlegung der Ergebnisse eine große Hilfe waren.

Herrn Dr. J. Henke, Institut für Rechtsmedizin der Universität Düsseldorf, bin ich zu Dank verpflichtet für die Bereitstellung unveröffentlichter Untersuchungsdaten zum Esterase D- und Glyoxalase I-System.

Herrn Dr. H.-G. Scheil möchte ich für seine zahlreichen Anregungen und Ratschläge bei der Fertigstellung der Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. H.T. Brüster, Direktor des Instituts für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin, gilt mein Dank für die großzügige Überlassung der Blutproben.

LEBENSLAUF

Name:	Ellen Elisabeth Bierotte
geboren:	3. Juli 1957 in Wuppertal
Eltern:	Werner Bierotte, Rektor Elfriede Bierotte, geb. Trippler
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Konfession:	evangelisch-lutherisch

Schulbildung

Volksschule:	1964 - 1967 in Wuppertal
Gymnasium:	1967 - 1976 in Wuppertal
Prüfungen:	4. Juni 1976 Reifeprüfung

Studium

Studienort:	Universität Düsseldorf
Studienfach:	Humanmedizin vom WS 1976/77 bis SS 1981
Prüfungen:	25. August 1978 Ärztliche Vorprüfung 30. August 1979 1. Ärztliche Prüfung 21. August 1981 2. Ärztliche Prüfung
Seit Oktober 1981:	Praktisches Jahr am Akademischen Lehrkrankenhaus der Universität Köln, Städtische Krankenanstalten Solingen

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353